

⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 43 33 821 A 1

⑳ Aktenzeichen: P 43 33 821.6
㉑ Anmeldetag: 4. 10. 93
㉒ Offenlegungstag: 6. 4. 95

⑤ Int. Cl.⁶:
C 08 F 8/36
C 08 F 8/32
C 08 F 291/08
C 08 J 5/20
C 08 L 51/00
B 01 D 15/08
B 01 J 41/14
B 01 J 41/06
B 01 J 39/20
B 01 J 39/06

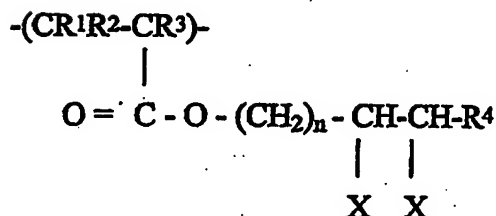
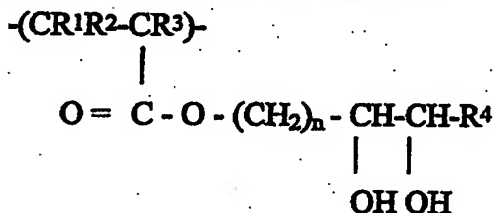
74

㉑ Anmelder:
Merck Patent GmbH, 64293 Darmstadt, DE

㉒ Erfinder:
Müller, Egbert, Dr., 64390 Erzhausen, DE; Gensert,
Roland, 63322 Rödermark, DE; Poguntke, Peter,
64853 Otzberg, DE

⑤4 Ionenaustauscher

- ⑤7 Die Erfindung betrifft Trennmateriellen für die Ionenaustauschchromatographie auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß
- a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,
 - b) die kovalentgebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,
 - c) die Polymeren sowohl Monomereinheiten der Formel II als auch der Formel III enthalten,
 - d) die Monomereinheiten linear verknüpft sind,



worin
R¹, R² und R³ unabhängig voneinander
H oder CH₃,
R⁴ H, C₁-C₅-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl,
n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,

ein Rest X OH und der andere Rest X NR⁵R⁶, N⁺R⁵R⁶R⁷ oder SO₃H
und
R⁵, R⁶ und R⁷ unabhängig voneinander
C₁-C₄-Alkyl, wobei einer oder beide Reste R⁵ und/oder R⁶
auch H sein können,
bedeuten.

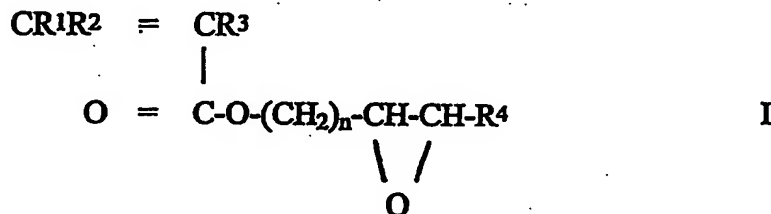
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Trennmateriale für die Ionenaustauschchromatographie.

Für die Ionenaustauschchromatographie insbesondere von Makromolekülen biologischen Ursprungs (Biopolymere) sind aus DE 38 11 042 ionische Pfropfpolymere bekannt, bei denen alle Monomereinheiten die jeweiligen ionischen Strukturelemente aufweisen. Trotz der im allgemeinen hervorragenden Eigenschaften dieser Ionenaustauscher, wurde bei einzelnen Anwendungen gefunden, daß einzelne Analytbanden nur unzureichend getrennt waren. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Trennmateriale mit verbesserten Eigenschaften bereitzustellen.

Aus der unveröffentlichten Anmeldung DE 43 10 964 sind oxiranhaltige aktivierte Trägermaterialien bekannt, bei denen Monomere der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger aufgepfropft sind,



worin

R^1, R^2 und R^3 unabhängig voneinander

H oder CH_3 ,

R^4 H, C_1-C_5 -Alkyl oder C_6-C_{12} -Aryl

und

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5 bedeuten.

Es wurde gefunden, daß sich diese aktivierten Trägermaterialien in an sich bekannter Weise zu Trennmateriale für die Ionenaustauschchromatographie umsetzen lassen. Die resultierenden Trennmateriale weisen verbesserte Eigenschaften auf.

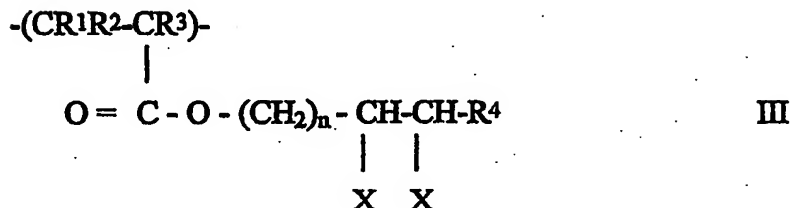
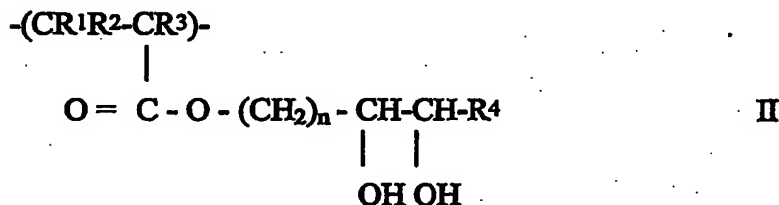
Gegenstand der Erfindung sind somit Trennmateriale für die Ionenaustauschchromatographie auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß

a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,

b) die kovalentgebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,

c) die Polymeren sowohl Monomereinheiten der Formel II als auch der Formel III enthalten,

d) die Monomereinheiten linear verknüpft sind,



worin

R^1, R^2 und R^3 unabhängig voneinander

H oder CH_3 ,

R^4 H, C_1-C_5 -Alkyl oder C_6-C_{12} -Aryl,

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,

ein Rest X OH und der andere Rest X NR⁵R⁶, N + R⁵R⁶R⁷ oder SO₃H
und

R⁵, R⁶ und R⁷ unabhängig voneinander

C₁ - C₄-Alkyl, wobei einer oder beide Reste R⁵ und/oder R⁶ auch H sein können,
bedeuten.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Trennmaterien bei der Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Ionenaustauschchromatographie.

Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zur Herstellung von Trennmaterien für die Ionenaustauschchromatographie, dadurch gekennzeichnet, daß aus DE 43 10 964 bekannte oxiranhaltige aktivierte Trägermaterialien mit schwefliger Säure oder ihren Salzen oder mit primären, sekundären oder tertiären Aminen der Formel IV

NR⁵R⁶R⁷ IV

umgesetzt werden, worin

R⁵, R⁶ und R⁷ unabhängig voneinander

C₁ - C₄-Alkyl, wobei einer oder zwei dieser Reste auch H sein können,
bedeuten.

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung der erfindungsgemäßen Trennmaterien.

Abb. 1 stellt eine Elutionskurve (Durchbruchkurve) dar; experimentelle Einzelheiten finden sich in Anwendungsbeispiel A. Abb. 2 stellt eine Elutionskurve einer chromatographischen Trennung von humanem Serumalbumin, Ovalbumin und Conalbumin dar; experimentelle Einzelheiten finden sich in Anwendungsbeispiel C.

Erfindungsgemäß können für die Herstellung von Kationenaustauschern mit Sulfonylgruppen schwefelige Säure oder ihre Salze verwendet werden. Für die Herstellung von Anionenaustauschern können primäre, sekundäre oder tertiäre Alkylamine mit 1-4 C-Atomen in der oder den Alkylkette(n) verwendet werden. Folglich können die Reste R⁵, R⁶ und R⁷ jeweils unabhängig voneinander Methyl, Ethyl, Propyl, iso-Propyl, n-Butyl, iso-Butyl oder tert.-Butyl bedeuten, wobei ein oder zwei dieser Reste auch Wasserstoff bedeuten können. Somit können beispielsweise für die Herstellung von Anionenaustauschern mit Aminogruppen Methylamin, Dimethylamin, Ethylamin, Diethylamin, Ethylmethylamin, Propylamin, Dipropylamin oder Methylpropylamin verwendet werden. Bevorzugt werden Dimethyl- oder Diethylamin verwandt. Für die Herstellung von Anionenaustauschern mit quaternären Ammoniumgruppen können beispielsweise Trimethylamin, Triethylamin, Ethyldimethylamin oder Diethylmethylamin verwendet werden, wobei die Verwendung von Trimethylamin bevorzugt ist.

Die genannten Verbindungen reagieren mit dem Oxiransystem, wobei bei Verwendung von schwefliger Säure oder ihren Verbindungen sulfonierte Kationenaustauscher entstehen. Bei der Verwendung von primären oder sekundären Aminen entstehen Anionenaustauscher mit Aminogruppen, bei der Verwendung von tertiären Aminen Anionenaustauscher mit quaternären Ammoniumgruppen. Überschüssige Oxirangruppen werden mit verdünnter Schwefelsäure zu Diolgruppen hydrolysiert. Die genannten ionischen Monomereinheiten der Formel III sind zu 5 bis 50 Molprozent, bevorzugt zwischen 10 und 30 Molprozent enthalten; die übrigen Monomereinheiten besitzen die Diolstruktur nach Formel II. Die Beladungsdichte läßt sich durch die Wahl der Konzentration der Reaktionspartner, d. h. der schwefligen Säure beziehungsweise der Amine, einstellen.

Die folgenden Beispiele sollen den Gegenstand näher erläutern; diese Beispiele stellen keine Einschränkung des Erfindungsgegenstandes dar.

Beispiele

Die folgenden Reaktionen werden in einem 500-ml-Dreihalskolben mit Rührer ausgeführt. Die Suspensionen werden durch Filtration auf einer Glasfritte (G2) gewaschen.

Beispiel 1

Herstellung eines oxiran-aktivierten Trägers ausgehend von Fractogel®-TSK HW 65 (S)

Zu einer Suspension aus 100 ml sedimentiertem Fractogel®-TSK HW 65 (S) und 66 ml Wasser werden mit 3 g Ammoniumcer(IV)nitrat (gelöst in einer Mischung aus 180 ml Wasser und 3 g HNO₃ (65%)) bei Raumtemperatur unter starkem Rühren vermischt. Nach 1 Minute erfolgt die Zugabe einer Lösung von 6 g (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat in 44 ml Dioxan. Es wird eine Stunde weitergerührt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt zweimal mit je 200 ml Wasser gewaschen.

Beispiel 2

Synthese eines mit Diethylamin substituierten Trägermaterials

100 g abfiltriertes Gel hergestellt nach Beispiel 1 werden in 100 ml Wasser suspendiert und 100 ml Diethylamin zugegeben. Anschließend wird 20 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Danach wird das Reaktions-

produkt zweimal mit je 100 ml Wasser gewaschen.

Das gewaschene Reaktionsprodukt wird in 100 ml einer 0,5 M Schwefelsäurelösung suspendiert und zwei Stunden bei 40°C langsam gerührt. Danach wird mit 0,25 M Phosphatpuffer (pH 7) bis zum Neutralpunkt, anschließend mit Wasser gewaschen. Das Gel wird in wäßriger Suspension unter Zusatz von 0,02% Natriumazid

gelagert.
Der resultierende DEA-Anionenaustauscher weist eine Kapazität von 160 mg Rinderserumalbumin/ml Gel auf.

Beispiel 3

Synthese eines mit Trimethylamin substituierten Trägermaterials

Die Herstellung erfolgt wie in Beispiel 2 beschrieben, wobei statt des Diethylamins 100 ml wäßrige Trimethylaminlösung (30%) eingesetzt werden.

Der resultierende quaternäre Anionenaustauscher weist eine Kapazität von 130 mg Rinderserumalbumin/ml Gel auf.

Beispiel 4

Synthese eines sulfonierten Trägermaterials

100 g abfiltriertes Gel hergestellt nach Beispiel 1 werden in einer Lösung von Na_2SO_3 (100 g/l) in Natriumphosphatpuffer 20 g/l; pH 8) suspendiert und bei 60°C drei Stunden gerührt. Danach wird das Reaktionsprodukt zweimal mit je 100 ml Wasser gewaschen.

Das gewaschene Reaktionsprodukt wird in 100 ml einer 0,5 M Schwefelsäurelösung suspendiert und zwei Stunden bei 40°C langsam gerührt. Danach wird mit 0,25 M Phosphatpuffer (pH 7) bis zum Neutralpunkt, anschließend mit Wasser gewaschen. Das Gel wird in wäßriger Suspension unter Zusatz von 0,02% Natriumazid gelagert.

Anwendungsbeispiel A

Ermittlung der Bindungskapazität mit Rinderserumalbumin (Durchbruchkurve)

Trägermaterial, hergestellt nach Beispiel 2, wird in eine Super-Formance® Glassäule (50 x 10 mm) gefüllt und mit dem Auftragepuffer (50 mM TRIS-Puffer, pH 8,3) äquilibriert. Eine Lösung von Rinderserumalbumin (10 mg/ml) in diesem Puffer wird kontinuierlich aufgetragen (Fluß: 0,5 ml/min) und das Elutionsdiagramm durch Photometrie bei 280 nm gemessen. Aus der Durchbruchkurve wird die Kapazität bestimmt.

Es wird eine steile Durchbruchkurve gefunden; die Kapazitätsberechnung ergibt 158 mg Rinderserumalbumin/ml Gel (siehe Abb. 1).

Anwendungsbeispiel B

Ermittlung der Bindungskapazität mit Rinderserumalbumin nach Behandlung mit 1 M NaOH

Je 10 ml Trägermaterial, hergestellt nach Beispiel 3, werden in je 40 ml 1 M NaOH suspendiert und im Wasserbad unter gelegentlichem Schütteln zwei Stunden erwärmt (40, 50 und 60°C). Anschließend werden die Proben in 50 mM TRIS-Puffer (pH 8,3) suspendiert. Die Bindungskapazität wird wie in Anwendungsbeispiel A beschrieben bestimmt:

Behandlung:	Kontrolle	40 °C	50 °C	60 °C
Bindungskapazität (mg/ BSA/ml)	84,7	105,7	84,4	73,3

Anwendungsbeispiel C

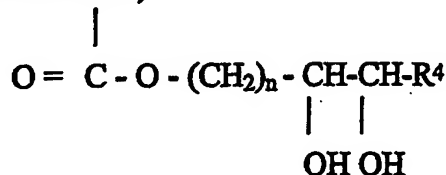
Trennung von humanem Serumalbumin, Ovalbumin und Conalbumin

Trägermaterial, hergestellt nach Beispiel 2, wird in eine Super-Formance® Glassäule (50 x 10 mm) gefüllt und mit dem Auftragepuffer (20 mM TRIS-Puffer, pH 8,0) äquilibriert. Eine Mischung enthaltend humanes Serumalbumin, Ovalbumin und Conalbumin (je 4 mg/ml) wird aufgetragen (200 µl). Eluiert wird bei einem Fluß von 1 ml/min mit einem Gradienten von 0 bis 1,0 M NaCl in 20 mM TRIS-Puffer, pH 8,0 (Dauer 100 Minuten). Das Elutionsdiagramm wird durch Photometrie bei 280 nm gemessen.

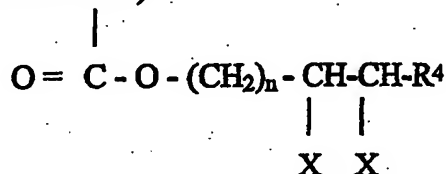
Die drei Proteine werden vollständig getrennt (siehe Abb. 2).

1. Trennmateriale für die Ionenaustauschchromatographie auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,
- b) die kovalent gebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,
- c) die Polymeren sowohl Monomereinheiten der Formel II als auch der Formel III enthalten,
- d) die Monomereinheiten linear verknüpft sind,



II



III

worin

R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander

H oder CH_3 ,

R^4 H, C_1 – C_3 -Alkyl oder C_6 – C_{12} -Aryl,

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5,

ein Rest X OH und der andere Rest X NR^5R^6 , N + $\text{R}^5\text{R}^6\text{R}^7$ oder SO_3H

und

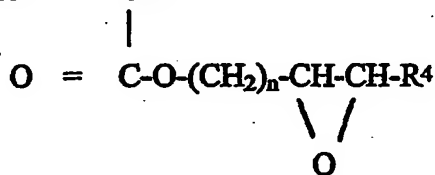
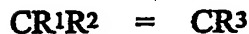
R^5 , R^6 und R^7 unabhängig voneinander

C_1 – C_4 -Alkyl, wobei einer oder beide Reste R^5 und/oder R^6 auch H sein können,

bedeuten.

2. Verwendung von Trennmateriale mit den Merkmalen von Anspruch 1 bei der Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Ionenaustauschchromatographie.

3. Verfahren zur Herstellung von Trennmateriale für die Ionenaustauschchromatographie, dadurch gekennzeichnet, daß oxiranhaltige aktivierte Trägermaterialien, bei denen Monomere der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger aufgepfropft sind,



I

worin

R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander

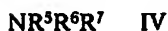
H oder CH_3 ,

R^4 H, C_1 – C_3 -Alkyl oder C_6 – C_{12} -Aryl

und

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

bedeuten, mit schwefliger Säure oder ihren Salzen oder mit primären, sekundären oder tertiären Aminen der Formel IV,



worin

R^5 , R^6 und R^7 unabhängig voneinander

$C_1 - C_4$ -Alkyl, wobei einer oder zwei dieser Reste auch H sein können, bedeuten, umgesetzt werden.

5 4. Verfahren zur Trennung von Gemischen mindestens zweier Substanzen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren, mittels Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung von Trennmaterialien mit den Merkmalen von Anspruch 1.

10 Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

Fig. 1

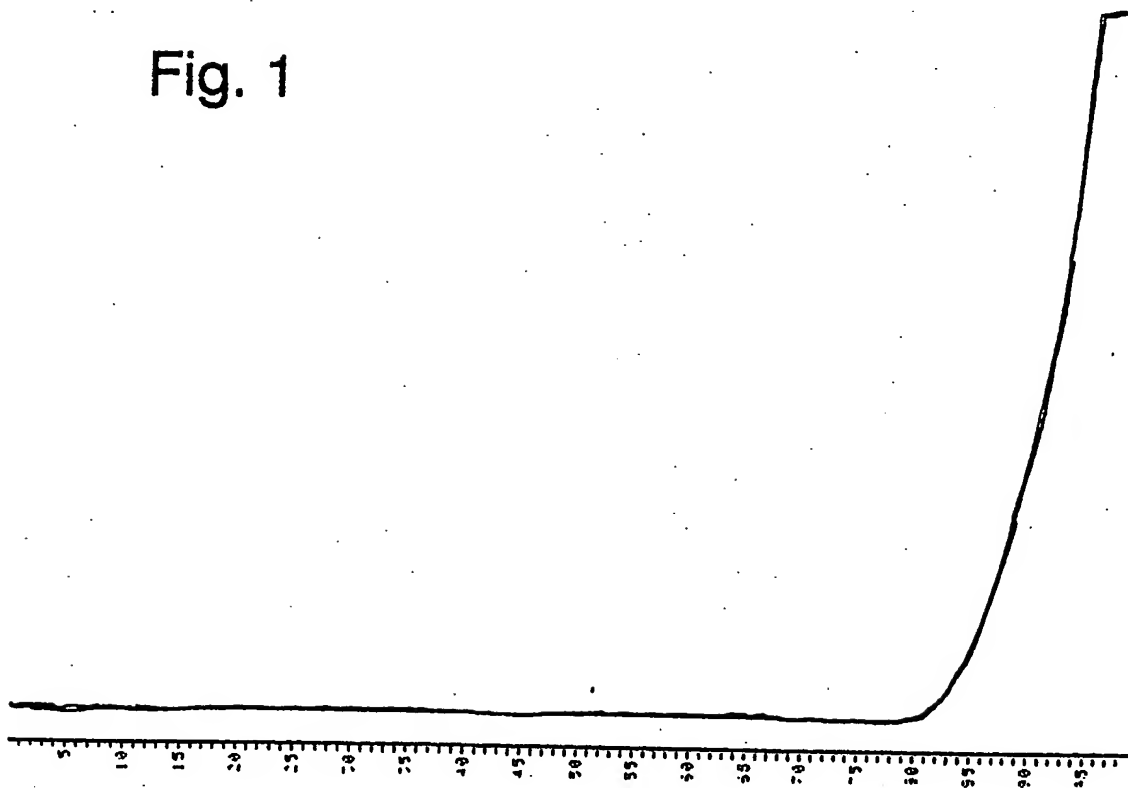


Fig. 2

